

CONSERVACIÓN *In vitro* POR CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Swietenia macrophylla* King, y *Tectona grandis* L.

In vitro CONSERVATION FROM MINIMUM GROWTH OF *Swietenia macrophylla* King AND *Tectona grandis* L.

Montiel-Castelán, P.¹; Castillo-Martínez, C.R.^{2*}; Gómez-Reyes, L.A.²; Valle-Arizaga, M.³; Jasso-Mata, J.⁴

¹Division de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, Km. 38.5, Texcoco Edo. de México. C. P. 56230. ²Centro Nacional de Recursos Genéticos-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias km. 8 carretera Tepatitlan-Lagos de Moreno, Col. Rancho las Cruces, Tepatitlan de Morelos, Jalisco c.p. 47600. ³Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan. ⁴Postgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Ed. México.

*Autor de correspondencia: castillo.carlos@inifap.gob.mx

RESUMEN

Con objeto de conservar *in vitro* las especies *Tectona grandis* L. y *Swietenia macrophylla* King, mediante la técnica de crecimiento mínimo en condiciones *in vitro*, se evaluaron concentración de manitol (10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ y 30 g L⁻¹) y aplicación de una capa de aceite mineral (2 ml) en combinación con tres temperaturas (18 °C, 24 °C, 28 °C). En *T. grandis*, el aceite mineral redujo significativamente el crecimiento, pero disminuyó el número de brotes y el vigor, mientras que en *S. macrophylla* aumentó el crecimiento y disminuyó el número de brotes y vigor del explante. Referente al uso de manitol, *T. grandis* y *S. macrophylla*, registraron que la aplicación de 15 g L⁻¹ al medio de cultivo redujo significativamente el crecimiento *in vitro*, se mantuvo el vigor y sobrevivencia, y la la temperatura de conservación de 18 °C, generó respuesta sinérgica y redujo el crecimiento *in vitro* con mayor eficiencia en ambas especies hasta quince semanas.

Palabras clave: Conservación *in vitro*, Crecimiento mínimo, caoba, teca.

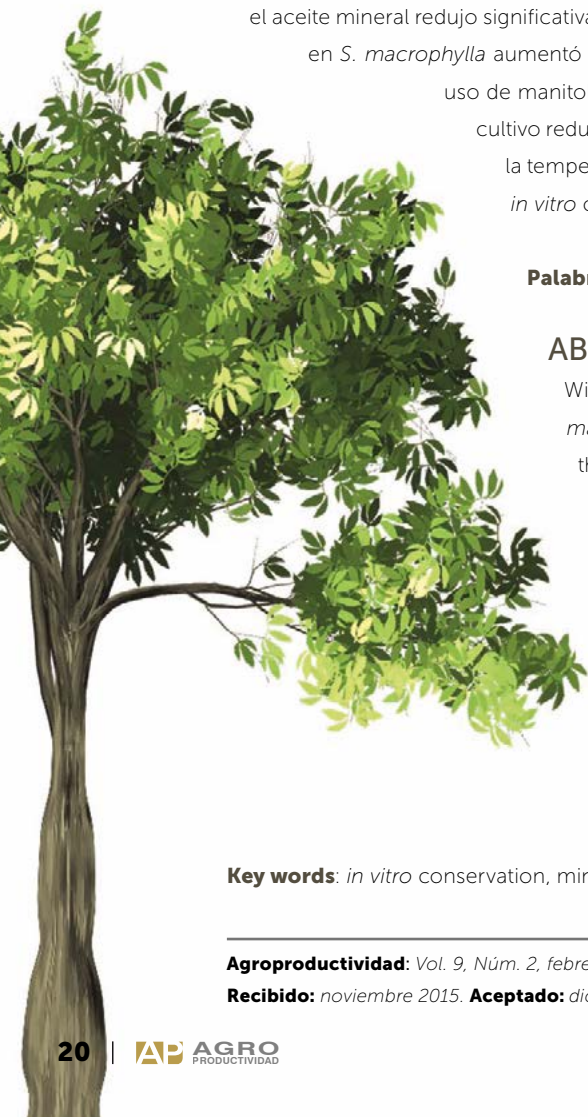
ABSTRACT

With the objective of conserving *in vitro* the species *Tectona grandis* L. and *Swietenia macrophylla* King, through the technique of minimum growth under *in vitro* conditions, the mannitol concentration was evaluated (10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ and 30 g L⁻¹), as well as the application of a layer of mineral oil (2 ml) in combination with three temperatures (18 °C, 24 °C, 28 °C). In *T. grandis*, the mineral oil reduced growth significantly, but it decreased the number of buds and the vigor, while in *S. macrophylla*, it increased growth and decreased the number of buds and vigor of the explant. With regard to the use of mannitol, *T. grandis* and *S. macrophylla* showed that the application of 15 g L⁻¹ to the cultivation medium reduced *in vitro* growth significantly, vigor and survival were maintained, and the conservation temperature of 18 °C generated a synergetic response and reduced *in vitro* growth with greater efficiency in both species up to fifteen weeks.

Key words: *in vitro* conservation, minimal growth, *Swietenia macrophylla* King, *Tectona grandis* L., mineral oil, mannitol.

Agroproductividad: Vol. 9, Núm. 2, febrero. 2016. pp: 20-25.

Recibido: noviembre 2015. **Aceptado:** diciembre 2015.



INTRODUCCION

Caoba (*Swietenia macrophylla* King) es una especie neotropical distribuida desde el norte del Golfo de México hasta Centroamérica, y posee una de las maderas de mayor valor e importancia económica, derivado de la belleza de su veteado y calidad y por ello se le considera, madera preciosa (Mayhew y Newton, 1998; Adolfo-Basil, 2007). La Teca (*Tectona grandis* L. f.), es otra especie maderable de fuerte impulso en el mercado, y registra propiedades únicas de estabilidad ideal para exteriores, construcción y acabados (Pandey y Brown, 2000; Shargel-Moreno y Hernando, 2005). Su centro de origen es Asia, desde la India hasta Myanmar, Laos y Tailandia (Weaver, 1993), Actualmente se tienen plantaciones comerciales en Centroamérica, principalmente en Costa Rica, y en México se tienen registro de individuos que llegaron en la década de los setenta y que actualmente ya se han registrado plantaciones. Ambas especies, Caoba y Teca se consideran de importancia en lo que respecta al potencial para ser utilizadas en plantaciones comerciales, con fines de aprovechamiento, sin embargo, sus semillas necesitan condiciones especiales de almacenamiento, registrando para la Teca, pérdida de viabilidad en condiciones de almacenamiento convencional (Abdelnour *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2000; Hine-Gómez *et al.*, 2013), mientras que las de Caoba poseen aceites de reserva que con el tiempo activan algunas enzimas que afectan la viabilidad y vigor (Gómez-Terejo *et al.*, 2006). Por lo anterior, se considera importante la búsqueda de métodos de conservación que se complementen con los bancos de semilla convencionales o áreas de conservación como para el caso de caoba. La técnica del crecimiento mínimo y conservación *in vitro*, que tiene como principio la disminución de la división celular y metabolismo de la planta (Roca *et al.*, 1994, García-Águila 2007), puede facilitar el resguardo de tejido vegetal de especies

de interés, y para lograrlo se recurre a la modificación del medio de cultivo y condiciones medio ambientales (Engelmann, 2011; Cruz-Cruz *et al.*, 2013). Esta forma de conservar se ha utilizado ampliamente en especies agrícolas como papa (*Solanum tuberosum* L.). Con estos precedentes y con el fin de aportar métodos para la conservación *ex situ* de estas especies forestales, se evaluaron concentraciones de manitol (medio osmótico), aceite mineral como limitante de la respiración de explantes cultivados y tres temperaturas (18 °C, 24 °C, 28 °C); para diseñar protocolo de conservación *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo y procesos de investigación se realizaron en el Centro Nacional de Recursos genéticos (CNRG) en Tepatitlán, Jalisco, México, con material *in vitro* previamente establecido procedente del campo experimental de San Felipe Bacalar, Quintana Roo, México.

El material vegetativo se conservó en medio Murashig y Skoog (1962), adicionado con carbón activado. Se prepararon medios de cultivo en 200 ml de volumen por tratamiento, los cuales consistieron de un medio con base en sales minerales y vitaminas de MS (Murasige y Skoog, 1962), adicionado con varias combinaciones de sacarosa/manitol 30/0, 20/10, 15/15, 10/20 y 30/0 gr L⁻¹. De cada tratamiento se realizó una réplica que además se adicionó con 2 ml de aceite mineral J.T. Baker® (previamente esterilizado en seco a 180 °C por 2 h) a una profundidad de 5 mm del medio. En campana de flujo laminar se disectaron los explantes previamente multiplicados *in vitro*, en segmentos de 1.5 mm los cuales se colocaron en el medio correspondiente a cada tratamiento y se sellaron con Parafilm®; cada tratamiento se replicó en tres temperaturas (18 °C, 24 °C y 28 °C) y conservaron durante tres meses. Cada cuatro semanas se evaluó el crecimiento, número de brotes, vigor y oxidación. Se empleó un diseño completamente al azar multifactorial. Para el análisis de datos se empleó el paquete estadístico SAS (Statistics Analysis Software) V. 9.1. y análisis de componentes principales usando la varianza y comparación de medias de Tukey, $\alpha=0.05$.



RESULTADOS

Efecto del Aceite mineral

El aceite mineral estimuló el crecimiento de *Swietenia macrophylla* King, a 18 °C y 24 °C, registrando para la primera temperatura disminución del número de brotes, aumento de oxidación y disminución del vigor (Cuadro 1).

El aceite mineral tuvo efecto en la disminución del crecimiento *in vitro* de *Tectona grandis* L. (Cuadro 2), sin embargo, el número de brotes fue menor y hubo más presencia de oxidación, además de que se desarrollaron tejidos hiperhídricos y necróticos.

Efecto del manitol

La temperatura y las concentraciones de manitol, tuvieron efecto en el crecimiento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King; a 18 °C con 15 g L⁻¹ de manitol (T3) y 30 g L⁻¹ de manitol (T5), disminuyeron significativamente su crecimiento. Ambos tratamientos son adecuados para la conservación *in vitro* hasta tres meses, el tratamiento T3 presentó menor número de brotes, mientras que T5, registró más oxidación y menor vigor, sin embargo T3 mostró mayor sobrevivencia de explantes que T5.

El efecto de la temperatura y la concentración de manitol en el vigor *in vitro* de *Tectona grandis* L., a 30 g L⁻¹ a temperatura de 18 °C y 24 °C presentaron vigor regular o medio, sin embargo, si la concentración de manitol disminuye a temperatura de 24 °C el vigor mejoró; y a 28 °C y 20 g L⁻¹ de manitol el vigor de los explantes disminuyó significativamente. El mayor daño de tejidos (obscurecimiento) fue registrado a 18 °C de conservación, atribuido a concentración osmótica alta (Cuadro 3). Las concentraciones de manitol produjeron un efecto significativo en el crecimiento de los explantes, ya que a medida que su concentración aumentó, el crecimiento disminuyó partiendo de 20 g L⁻¹ (tratamientos T4, T9, T14), registrando que el número de brotes y vigor disminuyeran significativamente. La concentración de 15 g L⁻¹ (tratamientos T3, T8, T13) de manitol disminuyó significativamente el crecimiento, mostrando buen vigor, número de brotes y bajo nivel de oxidación de explantes. Los tratamientos T3 y T8 presentaron mayor sobrevivencia respecto al tratamiento T13. El tratamiento T3 (15 g L⁻¹ a 18 °C) y T8 (15 g L⁻¹ a 24 °C) resultaron ser los tratamientos más adecuados en la conservación *in vitro* de *Tectona grandis* L., con adición de azúcares difíciles de metabolizar en este caso manitol (Cuadro 4).

Cuadro 1. Efecto del aceite mineral y temperatura en explantes de *Swietenia macrophylla* King, durante su conservación por 15 semanas en condiciones *in vitro*.

Temperatura (°C)	Aceite mineral	Media				Sobrevivencia (%)
		Longitud	Número de Brotes	Oxidación	Vigor	
18	T ₁	11.9 c	11 a	1.9 a	2.9 a	80
	T ₂	16.8 b	6 b	1.5 b	2.3 b	40
24	T ₃	16.5 b	10 a	2.0 a	3.3 a	100
	T ₄	25.7 a	11 a	1.9 a	3.1 a	100
28	T ₅	24.0 a	12 a	2.0 a	3.0 a	60
	T ₆	24.7 a	10 a	2.0 a	3.0 a	100

Cuadro 2. Efecto del aceite mineral y temperatura en explantes de *Tectona grandis* L. durante su conservación por 15 semanas en condiciones *in vitro*.

Temperatura (°C)	Aceite mineral	Media				Sobrevivencia (%)
		Longitud	Número de Brotes	Oxidación	Vigor	
18	T ₁	19.5 a	9.6 ab	2.0 a	3.3 a	100
	T ₂	8.5 b	4.2 bc	2.0 a	2.0 b	40
24	T ₃	25.4 ab	12.5 a	2.0 a	3.8 a	80
	T ₄	9.7 b	4.2 bc	1.7 a	2.3 b	80
28	T ₅	15.2 ab	10.4 ab	2.0 a	3.4 a	60
	T ₆	9.3 b	3.7 c	1.8 a	1.7 b	100

Dentro de las técnicas de conservación *in vitro* se encuentra la de crecimiento mínimo, que tiene como principio la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta (Roca *et al.*, 1994; García-Águila, 2007). Una reducción en el crecimiento de los tejidos *in vitro* se puede lograr mediante la disminución de los niveles de oxígeno disponibles, con el uso de una capa de aceite mineral o atmósferas controladas (Dorion *et al.*, 1994). *Tectona grandis* L. disminuyó su crecimiento cuando fue tratada con una capa de aceite mineral, lo cual se atribuyó a que las plantas pueden restringir la respiración y disminuir su consumo de ATP (trifosfato de adenosina), como respues-

ta adaptativa a niveles bajos de oxígeno (Geingenberger, 2003). Ensayos en la conservación *in vitro* de *Daucus carota*, *Vitis vinifera*, *Catharanthus*, *Valeriana Wallichii* (Johnson, 2002) y *Bacopa monieri* L. (Sharma *et al.*, 2012) coinciden en la eficiencia del aceite mineral como técnica de conservación, sin embargo en este caso el vigor y sobrevivencia *in vitro* disminuyó significativamente, y se presentaron tejidos hiperhidricos. Gaspar *et al.* (2002) señala que el estado canceroso de las células y la hiperhidricidad son estados adaptativos inducidos por estrés *in vitro*.

Swietenia macrophylla King, contrario a lo documentado en la conservación con aceite mineral aumento su crecimiento; cada especie responde de diferente forma ante una situación de estrés; y el nivel de tolerancia de cada especie se relaciona directamente con las tensiones a las que se vio sometida a lo largo de su vida y

que se han fijado genéticamente (Gaspar *et al.*, 2002), desarrollando mecanismos propios de adaptación (Şen, 2012). Respuestas similares a la obtenida con *Swietenia macrophylla* King con aceite mineral, fueron reportadas por Dorian *et al.* (1994), aplicando atmosferas controladas y disminución en el nivel de oxígeno *in vitro* de

melocotón y melocotón × híbrido almendro (GF 677) (*Prunus* spp.), contrario a lo esperado los explantes con menos oxígeno crecieron más, presentando más yemas e incrementando su peso seco.

Cada especie posee diferentes niveles de tolerancia ante niveles bajos de oxígeno, que se relaciona con la capacidad de poder eliminar el etanol por difusión, el aumento en la síntesis de las enzimas para eliminar los radicales libres (por ejemplo, superóxido dismutasa) y enzimas asociadas con la producción de compuestos antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico,

Cuadro 3. Efecto de las concentraciones de manitol y temperatura en la conservación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King durante 15 semanas.

Temperatura (°C)	Manitol	Media				Sobrevivencia (%)
		Longitud	Brotes (No.)	Oxidación	Vigor	
18	T ₁	11.9 cd	11 ab	0.1 ab	2.9 abc	87
	T ₂	14.9 cbd	9 abc	0.2 ab	2.8 bcde	87
	T ₃	12.7 cd	6 c	0.4 ab	2.6 abcde	93
	T ₄	13.2 cbd	8 abc	0.3 ab	2.7 cdef	80
	T ₅	12.7 cd	8 abc	0.2 ab	2.8 edf	80
24	T ₆	16.5 bc	10 abc	0.0 b	3.3 a	100
	T ₇	16.2 bc	10 abc	0.1ab	3.2 ab	100
	T ₈	17.4 b	9 abc	0.1 ab	2.8 abcd	100
	T ₉	15.3 cbd	9 abc	0.1 ab	3.1 bcde	100
	T ₁₀	13.4 a	9 abc	0.1 ab	2.5 eg	100
28	T ₁₁	24.0 a	13 a	0.0 b	3.0 ab	60
	T ₁₂	22.0 a	11 ab	0.1 ab	3.5 bcde	73
	T ₁₃	15.4 cbd	9 abc	0.5 a	2.5 bcde	93
	T ₁₄	14.5 cbd	8 bc	0.2 ab	2.7 g	100
	T ₁₅	15.0 cbd	6 c	0.4 ab	2.2 efg	87

Cuadro 4. Efecto de las diferentes concentraciones de manitol y temperatura, durante la conservación *in vitro* de explantes de *Tectona grandis* L., durante 15 semanas.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Media				Sobrevivencia (%)
	Manitol	Longitud	Brotes (No.)	Oxidación	Vigor	
18	T ₁	19.5 ab	9.6 abc	2.0 a	3.3 abc	100
	T ₂	9.8 cd	6.1 bcdef	1.8 a	2.7 bcde	40
	T ₃	6.5 cd	4.8 def	2.0 a	2.9 abcde	100
	T ₄	6.2 d	3.0 ef	1.3 bc	2.4 cdef	80
	T ₅	6.2 d	3.4 ef	1.0 c	2.0 egf	60
24	T ₆	25.4 a	12.5 a	2.0 a	3.8 a	80
	T ₇	14.1 bcd	9.6 abc	2.0 a	3.3 ab	100
	T ₈	8.1 cd	8.2 abcd	2.0 a	2.9 abcd	80
	T ₉	6.4 d	5.3 cdef	1.6 ab	2.6 bcde	100
	T ₁₀	7.0 cd	3.0 ef	1.7 ab	1.6 gf	100
28	T ₁₁	15.2 bc	10.4 ab	2.0 a	3.4 ab	60
	T ₁₂	7.5 cd	7.1 bcde	1.8 a	2.8 bcde	100
	T ₁₃	8.1 cd	6.1 bcdef	1.8 a	2.8 bcde	60
	T ₁₄	6.1 d	3.0 f	1.8 a	1.2 g	80
	T ₁₅	6.2 d	3.8 def	1.8 a	2.3 def	100

OL- tocoferol, y glutatión (Kozłowski y Pallardy, 2002). Pudieron ser muchos los factores que pudieron influir en el aumento del crecimiento de *Swietenia macrophylla* King, y por ello, se sugiere realizar más ensayos con diferentes genotipos sometidos a tratamientos con aceite mineral para poder estandarizar la respuesta.

La adición de manitol aunado con la reducción de temperatura se ha utilizado para reducir la tasa de crecimiento para la conservación de genotipos valiosos *in vitro* de *Solanum tuberosum*, *Dioscorea alata* (Thorpe, 2008) y *Sechium edule* (Alvarenga-Venutolo, 2010), ya que las plantas no tienen una ruta nativa para la biosíntesis de los alcoholes de azúcar (manitol y sorbitol) por lo que es difícil asimilarlos. Sin embargo una vez trasladados, pueden ser metabolizados y utilizados (Thorpe *et al.*, 2008), reduciendo el metabolismo y crecimiento de la planta *in vitro*. El uso de manitol y temperatura para la reducción del crecimiento de *Swietenia macrophylla* King y *Tectona grandis* L., fue significativa. A este respecto, Holobiuc *et al.* (2009), señalan que la adición de manitol disminuyó el potencial osmótico del medio de cultivo, y redujo la absorción de nutrientes, afectando el crecimiento, sin embargo, altas concentraciones de manitol puede tener consecuencias desfavorables para el desarrollo del explante, como se observó con los tratamientos a 25 g L⁻¹ y 30 g L⁻¹, que redujeron el vigor, número de brotes y sobrevivencia del explante, contrario a la adición de 15 g L⁻¹ de manitol a 18 °C, que redujo el crecimiento, presentó buen vigor, menos oxidación y buen número de brotes respecto al testigo. En general la temperatura

controla el crecimiento y desarrollo de la planta debido a su efecto directo en el metabolismo del explante, específicamente en la actividad enzimática, y combinada con otros factores puede reducir el crecimiento (Alvarenga *et al.*, 2007). La velocidad a la que el material vegetal crece *in vitro* generalmente disminuye lentamente a medida que la temperatura se reduce (Thorpe *et al.*, 2008). Considerando que *Swietenia macrophylla* King y *Tectona grandis* L., son especies tropicales que de acuerdo con Whitters (1985), su temperatura de almacenamiento

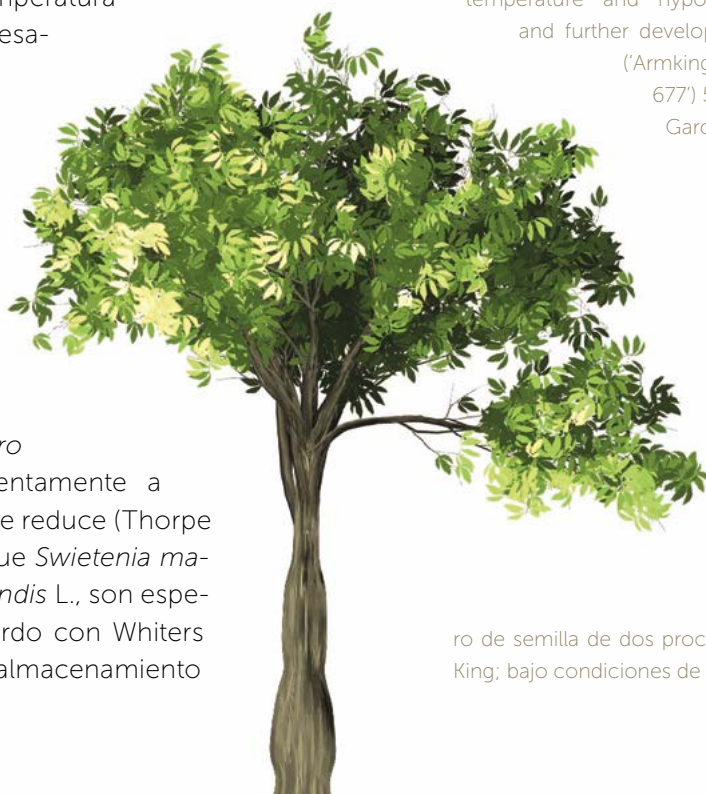
debe estar entre 15-20 °C, en esta investigación tanto los tratamientos con aceite mineral como los de manitol, presentaron menor crecimiento a 18 °C, y de acuerdo con Whitters *et al.* (1990), disminuir la temperatura es una estrategia de conservación para reducir el crecimiento de cultivos *in vitro*.

CONCLUSIONES

El aceite mineral no resultó ser adecuado en la conservación de germoplasma *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King y *Tectona grandis* L., aun cuando la tasa de crecimiento aumentó en la primera, y en teca disminuyó, sin embargo, no registró buen vigor y la sobrevivencia de los explantes fue baja. El uso de manitol en la limitación del crecimiento *in vitro*, representa una alternativa de conservación para teca y caoba (15 g L⁻¹ a 18 °C).

LITERATURA CITADA

- Adolfo-Basil J.G. 2007. Diversidad genética en poblaciones de *Swietenia macrophylla* King (meliaceae) en Costa Rica y Bolivia. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE). pp. 1-88.
- Alvarenga-Venutolo S., Abdetnour-Esquivel A., Villalobos-Aránbula, V. 2007. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agronomía Mesoamericana 18: 65-73.
- Cardoso F., Pita J.M., Palmeira J. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Campaña Grande. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 2:67-71.
- Cruz-Cruz A.C., González-Arnao M.T., Engelmann F. 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Journal Resources. 2: 73-95.
- Dorion N., Regnard J.L., Serpete I., Bigot C. 1994. Effects of temperature and hypoxic atmosphere on preservation and further development of *in vitro* shoots of peach ('Armking') and peach x almond hybrid ('GF 677') 57(3):201-213
- García-Águila L., de Fera M., Acosta K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal. 7(2): 67-79.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommes J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation. 37 (3): 263-285.
- Gómez-Terejo J., Jasso-Mata J., Vargas-Hernández J.J., Soto-Hernández M.R. 2006. Revista Ra Ximhai. Deterioro de semilla de dos procedencias de *Swietenia macrophylla* King; bajo condiciones de almacenamiento. 2 (1): pp. 223-239.



- Hine-Gómez A., Vargas-Castillo P., Abdelnour-Esquivel A. 2013. Crioconservación de semillas de teca (*Tectona grandis* L.f.). Agronomía Costarricense. 37(1): 51-60.
- Holobiuc M., Blindu R., Mitoi M., Helepciuc F., Cristae V. 2009. The establishment of an *in vitro* gene bank in *Dianthus spiculifolius* Schur and *D. glacialis* ssp. *Gelidus* (Shott Nym. et Otschy) Tutin: I. The initiation of a tissue collection and the characterization of the cultures in minimal growth conditions. Annals of forest research. 52: 117-128
- Johnson D., Hodgkinson M.C., Joyce D. 2002. Potential effects of petroleum-derived spray oils on abscission, senescence and stress physiology of citrus. (In:) Beattie, G.A.C; Watson, D.M; Steven, M.L; Rae D. J; Spooner-Hart, R.N. (eds). Spray oils beyond 2000. Sydney: University of Western Sydney, 185-192.
- Kozłowski T.T., Pallardy S.G. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. The Botanical Review. 68(2): 270-334
- Mayhew J.E., Newton A.C. 1998. The silviculture of mahogany. Edinburgh, UK, University of Edinburgh, CABI Publishing. 226 pp.
- Pandey D., Brown C. 2000. La teca una visión global. Unasylva 51: 3-13.
- Roca W.M., Escobar R., Mafla G. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.
- Şen A. 2012. Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. Chapter 3.
- Shargel-Moreno I., Hernando G. 2005. Sistemas agroforestales como alternativas en las explotaciones pecuarias. IX Seminario de Pastos y Forrajes. pp. 137-130.
- Sharma N., Satsangi R., Pandey R., Singh R., Kaushik N., Tyagi R.K. 2012. *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. Plant Cell Tiss Organ. Cult. 111:291-301.
- Thorpe T., Stasolla C., Yeung E.C., de Klerk G-J., Roberts A., George E.F. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Ed: George, E.G; M. A. Hall, Geert-Jan De Klerk. 3rd Edition, volumen 1, ed: 115 -175
- Weaver P.L. *Tectona grandis* L.f. Teak. New Orleans: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1993. 18 p.
- Whiters L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. In: Plant Cell Culture a practical approach (Ed. R. A. Dixon). IRL Press. Oxford-Washington D.C. 169 p.

